

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D	02 MAR 2004
WIPO	PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 59 703.0

Anmeldetag: 19. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: IVONEX GmbH, Kiel/DE

Bezeichnung: Trennungsverfahren

IPC: C 12 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 09. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

(Holl)

Ivonex GmbH, Kiel

Trennungsverfahren

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Trennung von Zellen, insbesondere zur Probenaufbereitung in der Tumordiagnostik. Genauer betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Probenaufbereitung zum Nachweis von Tumorzellen solider Tumoren bei der Diagnostik zur Prognose und Stratifizierung der Therapie, umfassend das Zerstören von Zellen, die diese Diagnosemöglichkeit erschweren bzw. gänzlich unmöglich machen. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit zur Probenaufbereitung und zum Nachweis von veränderten Zellen. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des Verfahrens und des Kits in der Diagnostik von veränderten Zellen, wie Tumorzellen, und der Durchführung einer PCR-Reaktion zum Nachweis von Tumorzellen in Körperflüssigkeiten und Geweben.

Stand der Technik

Die Trennung von verschiedenen Zellpopulationen ist ein zentraler Punkt in der Analyse unterschiedlicher Zellpopulationen. Es sind im Stand der Technik verschiedenste Verfahren zur Trennung von Zellen bekannt, die meist auf unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften oder auf Unterschieden in der Expression von bestimmten Molekülen beruhen.

Der Nachweis zirkulierender und/oder mikrometastatischer veränderter Zellen, wie Tumorzellen, in einer Mischung von Zellen unterschiedlicher Zellpopulationen, dient einer frühen Beurteilung der Prognose des Patienten sowie einer Stratifizierung für mögliche sog. adjuvante Therapieschritte. Für eine sinnvolle Frühdiagnostik muss eine äußerst geringe

Zahl veränderter Zellen in der zu analysierenden Probe spezifisch nachweisbar sein.

Tumorzellen und andere veränderte Zellen weisen im Vergleich zu ihren normalen Vorläufern praktisch immer genetische Veränderungen auf. Die Veränderungen betreffen entweder das Auftreten tumorassozierter und charakteristischer Genexpressionsprofile und/oder sind durch spezifische Genmutationen gekennzeichnet. Der Nachweis letzterer (z.B. Mutationen in den Genen p53, BRCA1 & 2, APC und andere) ist auf DNA-Ebene mit der diagnostisch notwendigen Empfindlichkeit bisher technisch dann nicht möglich, wenn die Tumorzellen gegenüber den Normalzellen in der Probe unterrepräsentiert sind.

Demgegenüber ist der Nachweis von veränderten Zellen, wie Tumorzellen, mit der Amplifikation einer sogenannten "gewebespezifischen mRNA-Expression" in der gebotenen Empfindlichkeit durchführbar (sog. molekulares Staging), wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

- a.) Das Ursprungsorgan des Tumors ist bekannt. Es lassen sich gewebespezifische mRNA-Marker definieren, wie z.B.
 - i.) Cytokeratine, die generelle Epithelmarker darstellen und bei bösartigen Tumoren epithelialer Herkunft (Karzinomen) nachweisbar bleiben.
 - ii.) Sogenannte Differenzierungsmarker unterschiedlicher Gewebe wie z.B. CEA (bei Dickdarmkarzinom), PSA (bei Prostatakarzinom), AFP (bei Leberkarzinom), Tyrosinase (bei malignem Melanom) u.a..
- b.) Die in der Untersuchungsprobe sonst noch vorhandenen normalen Zellen (normale Blutleukozyten einer Blutprobe) exprimieren die für das molekulare Staging als Target eingesetzte mRNA-Marker nicht: Umgekehrt eignen sich die mRNA-Marker, die in normalen Zellen exprimiert werden, nicht für das Staging.

Sind die Voraussetzungen erfüllt, lassen sich mit geeigneten empfindlichen Methoden vagabundierende veränderte Zellen, wie Tumorzellen, in einer Untersuchungsprobe über das gewebespezifische mRNA-Expressionsprofil im Gegensatz zu den tumorspezifischen Genmutationen auch innerhalb eines großen Überschusses normaler Zellen nachweisen.

Technisch beruht der Nachweis auf der in-vitro Herstellung einer cDNA-Kopie der Target-mRNA mit Hilfe der reversen Transkription mit anschließender DNA Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Dieser Nachweis ist mit hoher Empfindlichkeit möglich und erfasst üblicherweise eine einzelne Tumorzelle in 10E6 bis 10E7 normaler Blutzellen (d.h. 1 ml Blut).

Bisher hat die Anwendung von RT-PCR Tests jedoch gravierende Einschränkungen. Eine Vielzahl gewebespezifisch exprimierter Gene sind beschrieben, die sich grundsätzlich für den Nachweis der aus diesen Geweben abgeleiteten veränderten Zellen, wie Tumorzellen, eignen. Der Versuch dieses Nachweises ist aber aus den folgenden Gründen nicht immer erfolgreich, was sich durch system-immanente Besonderheiten derartiger Amplifikationssysteme ergibt, die untenstehend erwähnt werden:

Die analytische und die diagnostische Sensitivität von Nachweisverfahren auf RT-PCR Basis ist sehr hoch. D.h. die Methode erlaubt den sicheren Nachweis einzelner Moleküle in Testsystemen bzw. in klinischem Untersuchungsmaterial. Daneben ist die analytische Spezifität sehr hoch. D.h. fehlerhafte Amplifikation anderer als der gewünschten mRNA-Moleküle durch sogenannte Kreuzhybridisierung der Primer lässt sich unter geeigneten Bedingungen sicher ausschließen.

Demgegenüber ist die diagnostische Spezifität unzureichend. D.h. regelmäßig werden auch in klinischen Proben von Normalpersonen oder Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen

positive Resultate für die gewählte "tumorassoziierte" Ziel-mRNA gefunden. Positive RT-PCR Resultate können also auch durch nicht-maligne Zellen der Probe verursacht werden. Entsprechend lässt sich ein Ergebnis im Einzelfall hinsichtlich der diagnostischen Beurteilung schwer interpretieren.

Die daraus resultierende niedrige diagnostische Spezifität erklärt, warum sich der Nachweis zirkulierender Tumorzellen durch RT-PCR für die Diagnostik minimaler Resterkrankung bisher nicht hat durchsetzen können (Jung et al., EJCCCB, 1997, Jung et al., J Lab Med, 1999). Tatsächlich erlauben die falsch-positiven Ergebnisse nicht die Nutzung dieser an sich sehr vorteilhaften Methode.

Der wesentliche Grund für die unzureichende diagnostische Spezifität liegt in einer mRNA-Hintergrundexpression (synonym: illegitime Transkription; Background-Transkription) durch die in der Untersuchungsprobe enthaltenen normalen Zellen (z.B. in Blut und Knochenmark durch weiße Blutzellen). Es konnte gezeigt werden, dass normale, weiße Blutzellen tumor-assoziierte mRNA-Marker exprimieren können. Diese "illegitime" Expression ist auf der Basis der einzelnen Zelle spärlich, führt aber durch die hohe Zahl dieser natürlich vorkommenden Zellen in der Probe zu einem deutlich messbaren Signal und somit zu den genannten unspezifisch positiven Ergebnissen. Das Muster der Hintergrundexpression kann dabei konstitutiv sein (Jung et al., Br. J. Cancer (1999)), oder z.B. im Rahmen einer Entzündungsreaktion induziert (Jung et al., Br. J. Cancer, (1998)) werden.

Aus der Literatur ist inzwischen ersichtlich, dass das Problem der Hintergrundexpression den Nutzen der Methode wesentlich verringert. Entsprechend wurden zur Erhöhung der Spezifität verschiedene Verfahren vorgeschlagen, die wie die üblichen Trennungsverfahren die physikalischen oder Expressions-spezifischen Eigenschaften der zu trennenden

Zellen nutzen. Allerdings weisen diese Verfahren häufig wesentliche diagnostische Einschränkungen für die klinische Nutzbarmachung auf.

Die gebräuchlichste Methode zur Trennung von Zellpopulationen, z.B. aus dem Vollblut, ist die sogenannte FICOLL-Dichtegradienten-Zentrifugation. Zum FICOLL-Gradienten existieren eine Vielzahl von Varianten desselben Prinzips. Dieses beruht auf einer Anreicherung mononukleärer Zellen, in denen dann der Nachweis einer Tumorzelle geführt wird.

Die FICOLL-Methode ist nicht standardisierbar, d.h. sie besitzt eine unterschiedliche Effektivität in der Wiedergewinnung der separierten Zellen. Die Sensitivität des Tumorzellnachweises ist maßgeblich vom technischen Geschick des Untersuchers abhängig (Krüger et al., Clin Chem, 2000). Daneben ist die Wiedergewinnung und Anreicherung von veränderten Zellen, wie Tumorzellen, auch aufgrund ihres nicht vorhersagbaren Sedimentationsverhaltens unsicher. Zusammenfassend betrachtet ist unklar, ob und wie viele Tumorzellen bei der Zentrifugation verloren gehen und ob sich Tumorzellen bezüglich ihrer spezifischen Dichte generell so homogen verhalten, dass sie sich stets mit mononukleären Zellen zusammen separieren lassen und nicht in der verworfenen Granuloytenfraktion sedimentieren. Insgesamt wird von einer Wiederfindung von zwischen 10 - 70 % berichtet.

Als zweites wesentliches Prinzip der Anreicherung von Zielzellen gilt die Immunobead-Anreicherung. Dieses Verfahren geht davon aus, dass man veränderte Zellen, wie Tumorzellen, selektiv aus einem Zellgemisch über Bindung an paramagnetische Partikel gewinnen kann. Voraussetzung ist die Expression eines tumorassoziierten Markers in geeigneter Dichte auf der Oberfläche der Tumorzelle. Paramagnetische Partikel, an welche ein gegen diesen Marker gerichteter Antikörper gebunden ist, adsorbieren an die Zielzellen, um diese anschließend mittels Magnet aus der Lösung

anzureichern. Die erfolgreiche Bindung des Antikörpers erfordert eine ausreichende Dichte des Markers an der Zelloberfläche.

Die Methode der Immunobead-Anreicherung hat zwei limitierende Voraussetzungen:

1) Der Marker muss ein Oberflächenmarker sein und ist damit abhängig vom Tumortyp. Allerdings bedingt die Heterogenität von Karzinomen eine nicht gleichmäßig hohe und geeignete Expression des Markers auf allen individuellen Tumoren bzw. ihren Metastasen. Die Zahl der Moleküle an der Oberfläche, die für eine erfolgreiche Anreicherung wesentlich ist, ist im wesentlichen unbekannt.

2) Um die Zellen in intaktem Zustand zu verarbeiten, erfordert die Methode die Verarbeitung der nativen Untersuchungsprobe unmittelbar im Anschluss an die Probennahme. Eine Degradation der empfindlichen mRNA ist bereits innerhalb von Stundenfrist nach Abnahme zu beobachten (Gerhard et al., J Clin Oncol 1994 Apr;12(4):725-9). Durch die damit einhergehende sinkende mRNA-Qualität sinkt auch die diagnostische Sensitivität eines RT-PCR Tests rasch ab. Daraus folgt, dass sowohl die Probenverarbeitung als auch der Zeitfaktor für die Immunobead Separation zum Nachweis einzelner Tumorzellen auf der Basis gewebespezifischer mRNA von entscheidender Bedeutung sind. Diese Voraussetzungen sind für eine Routineanwendung in der Diagnostik nicht gegeben.

Die Anmeldung US 2002/0012931 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen, bei dem die Zellen verantwortlich für falsch-positive Signale beim Nachweis von GC-C (guanylyl cyclase C) als CD34-positive Zellen im Blut identifiziert wurden. Diese falsch-positiven Zellen sollen daher gemäß dem dort beschriebenen Verfahren durch Eliminierung aus der Zellmischung entfernt werden, z.B. über Immunobeads. Anschließend erfolgt dann der Nachweis der GC-C mRNA in den verbliebenen Zellen. Hier erfolgt also eine Negativselektion der veränderten Zellen, d.h. die für das

falsch-positive Signal verantwortlichen Zellen werden herausgetrennt.

Für beide oben dargelegten Verfahren gilt die zwingende Notwendigkeit, für eine unmittelbar anschließende Weiterverarbeitung zu sorgen, damit die Integrität der mRNA innerhalb der gewonnenen Zellen gewährleistet ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, diese Einschränkungen auch bei der standardisierten Durchführung auszuräumen. Insbesondere dann, wenn sich eine RT-PCR Untersuchung in der Routinediagnostik an das Auftrennungsverfahren anschließen soll. Hierzu muss das erfindungsgemäße Verfahren folgende Voraussetzungen erfüllen:

- 1) Die in der Untersuchungsprobe für die illegitime Expression verantwortlichen Zellen (Subpopulationen) müssen sich einfach abtrennen lassen.
- 2) Dabei sollten die oben genannten abzutrennenden Subpopulationen und ihre Bestandteile aus der Probe "entsorgt" werden. Die mRNA-Expression aus den Hintergrundzellen muss mit dieser Entsorgung beseitigt sein.
- 3) Das Verfahren muss mit einem Minimum an Aufwand am Entnahmestandort sicher durchführbar sein, damit es standardisierbar ist. Standardisiert bedeutet in diesem Zusammenhang, dass zum einen die Vorrichtungen für die Probenentnahme konfektionierbar sein müssen. Zum anderen ist es erforderlich, dass das Probenentnahmeprotokoll so gestaltet ist, dass es von unterschiedlichen Untersuchern aufgrund gleicher Vorgehensweise gleich effizient durchgeführt werden kann. Definitionsgemäß kann hierzu kein technisch unstandardisiertes Verfahren (z.B. FICOLL-Dichtegradient, Immunseparation) verwendet werden.
- 4) Das Verfahren darf am Ort der Abnahme nicht an die Notwendigkeit des Vorhaltens aufwendiger technischer Geräte geknüpft sein, weil es dann nicht für eine breite Anwendung routinefähig ist.

5) Das Verfahren muss so schnell durchführbar sein, dass die Integrität der mRNA in der Probe nicht gefährdet wird. Andernfalls wird die diagnostische Sensitivität kritisch erniedrigt.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Um die o.a. Erfordernisse zu erfüllen, umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zur Trennung der normalen zellulären Subpopulation(en) bzw. Fraktion(en) - wie unten definiert - von den veränderten Zellen in einer Probe den Schritt des Inkubierens der Mischung von Normalzellen und veränderten Zellen in einer hypotonen Lösung und Zerstörung von Fraktionen davon.

Das Verfahren basiert dabei auf dem neuen Gedanken, im Gegensatz zur bisher gängigen Methodik, verschiedene für die illegitime Expression des zu untersuchenden mRNA-Markers verantwortliche zelluläre Subpopulation(en) bzw. Fraktion(en) in der Lösung durch hypotonen Einfluss zu zerstören, bevor die Probe zur Analyse der veränderten Zellen weiterverarbeitet wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann dabei weiterhin den Schritt des Gewinnen der nicht eliminierten Zellen umfassen. Sollte das Verfahren zur weiteren Analyse der gewonnenen Zellen genutzt werden, so schließt sich an den Wiedergewinnungsschritt ein Analyseschritt, z.B. eine RT-PCR an.

Es zeigte sich, dass eine Inkubation in einer hypotonen Lösung zu einer differenzierten Zerstörung von Zellfraktionen in Proben führt. Insbesondere weisen veränderte Zellen, wie Tumorzellen, einen größeren Widerstand gegen die hypotonen Verhältnisse in der Lösung auf als üblicherweise in der Probe vorkommende Zellpopulationen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zum Nachweis von veränderten Zellen, wie Tumorzellen, verwendet werden. Eine Möglichkeit ist die Nutzung des Verfahrens zur Diagnose von metastasierendem Krebs.

Erfindungsgemäß wird auch ein Kit zum Nachweis von veränderten Zellen, wie Tumorzellen bereitgestellt. Dieses Kit umfasst eine hypotone Lösung oder Mittel um die Lösung hypoton zu machen und Primer zum Nachweis von mRNA kodierend für einen tumorspezifischen Marker. Weiterhin umfasst das Kit bevorzugt eine RNA-stabilisierende Lösung, umfassend ein hoch konzentriertes chaotropes Salz.

Dieses Kit kann zu Diagnose von metastasierendem Krebs eingesetzt werden.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Figur 1: Fig.1a zeigt den Nachweis von Cytokeratin 20 (CK20) und (PBGD) unter verschiedenen hypotonen Bedingungen bei Normalblut. Fig. 1b zeigt den Nachweis von Cytokeratin 20 (CK20) und (PBGD) unter verschiedenen hypotonen Bedingungen bei Normalblut mit einer bestimmten Anzahl von Tumorzellen (HT29).

Figur 2: Fig. 2 zeigt den Nachweis von Cytokeratin 20 (CK20) und (PBGD) unter verschiedenen hypotonen Bedingungen bei Normalblut mit 25 Tumorzellen (HT29).

Figur 3: Fig. 3 zeigt den relativen Anteil der Granulozyten-Subpopulation innerhalb der Blutzellen in Abhängigkeit der Behandlung mit hypotonen Lösungen.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Zum Verständnis der Anmeldung werden die folgenden Begriffe, wie sie hier verwendet werden näher erläutert.

Osmolarität/ Osmolalität: Die Osmolarität gibt die Konzentration osmotisch wirksamer Teilchen in 1 Liter Untersuchungsmaterial (osm/L) an. Die Osmolalität gibt die Konzentration osmotisch wirksamer Teilchen in 1 kg Lösungsmittel (osm/kg). Milliosmole werden mit mosm abgekürzt.

Hypotonie: Lösungen mit gleichem osmotischem Druck sind isoton. Lösungen mit erhöhter Osmolalität werden als hyperton, Lösungen mit erniedrigter Osmolalität als hypoton bezeichnet.

Zerstören von Zellen: Aufhebung der Zellintegrität durch chemisch-biologische oder physikalische Methoden. Zum Beispiel werden bei der Zugabe einer hypotonen Flüssigkeit Zellen zum Platzen gebracht.

Tumor-assoziierte/spezifische mRNA: Im Verlauf der Genexpression werden von einem Gen (DNA) eine oder mehrere "Kopien" in Form der mRNA (messenger RNA) erstellt. Dieser Vorgang wird als Transkription bezeichnet. Im weiteren Verlauf wird die genetische Information der mRNA in eine Aminosäuresequenz übersetzt (Translation). Auf diese Weise entstehen Eiweiße, welche multiple Aufgaben übernehmen. Tumor- spezifische / assoziierte RNA Moleküle sind charakteristisch für Tumoren und werden nicht bzw. häufig in geringer Menge in normalen Zellen gebildet. Die für ein tumorassoziiertes Molekül kodierende mRNA ist damit der Vorläufer des durch immuncytochemische Verfahren nachweisbaren Tumormarkers.

Solide Tumore: Solide Tumore unterscheiden sich von nicht-soliden Tumoren in der Bildung einer messbaren, zusammenhängenden Tumormasse. Als Beispiel für solide Tumoren lassen sich die Karzinome, als Beispiel für nicht-solide Tumore die Leukämie anführen.

Stabilisieren: Im vorliegenden Fall wird unter Stabilisierung zum einen die Verhinderung des Abbaus der RNA verstanden, zum anderen der Schutz von Tumorzellen vor Zerstörung durch eine hypotone Lösung.

Bestandteile der Zellen: Unter Zellbestandteilen werden alle Strukturen, Substanzen und Moleküle gerechnet, die die Zelle in Ihrer Form und Funktion definieren. Hierzu gehören z. B. der Zellkern, die Zellmembran, das Zytoplasma, die DNA, RNA, Proteine usw.

Zellen: Gemeint ist die Gesamtheit, der den Menschen ausmachenden Zellen.

Zellarten: Gemeint sind bestimmte Zellen wie z.B. Blutzellen oder Tumorzellen, Darmepithelzellen usw.

Zellpopulationen: Gemeint sind Untergruppen innerhalb einer Zellart wie z.B. die weißen (Leukozyten) und roten (Erythrozyten) Blutzellen innerhalb der Blutzellen.

Subpopulationen: Gemeint sind Untergruppen innerhalb der Zellpopulationen wie z.B. die Granulozyten und Lymphozyten innerhalb der weißen Blutzellen (Leukozyten)

Zellfraktionen: Gemeint sind Untergruppen innerhalb der Subpopulationen wie z.B. die Eosinophilen und Basophilen innerhalb der Granulozyten.

Normalzellen/Nicht-Tumorzellen: Gemeint sind alle nicht maligne oder anderweitig veränderten Zellen. Im Vorliegenden

Fall wird von normalen Blutzellen ausgegangen. Im Gegensatz dazu stehen die veränderten Zellen, wie Tumorzellen oder Vorläufern von Tumorzellen.

Hintergrundexpression: Veränderte Zellen wie z.B. Tumorzellen exprimieren große Mengen bestimmter Markermoleküle (z.B. tumor-assoziierte mRNA's wie CK20- CEA- oder PSA-mRNA) welche für bestimmte Zellarten wie Epithelzellen charakteristisch sind. Normale Blutzellen exprimieren z.T. sehr geringe Mengen dieser mRNA's. So führt die große Zahl normaler Blutzellen in einer Probe zu einem Signal, welches dem von wenigen das Markermolekül in großen Mengen produzierenden Tumorzellen entspricht.

Diese Expression von Markermolekülen auf sehr niedrigem Niveau durch normale Blutzellen wird hier als Hintergrund definiert, Synonyme für die Hintergrundexpression sind illegitime Transkription; Background-Transkription.

CP-Wert: Der "Crossing Point" (CP-Wert; Schwellenzyklus) einer PCR-Reaktion gemessen im Lightcycler (Roche) ist der PCR-Zyklus, bei der die PCR-Amplifikation in die exponentielle Phase eintritt. Gemeint ist damit genau der Zeitpunkt der PCR-Reaktion (Zyklusnummer) bei der die Fluoreszenz einer bestimmten Reaktion über die Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt. Dieser Zeitpunkt verhält sich am zuverlässigsten proportional zu der am Anfang der Amplifikation vorhandenen Konzentration des Templates. Dieser Zeitpunkt wird durch die Lightcycler-Software von Roche automatisch graphisch ermittelt.

Je niedriger ein CP-Wert, desto mehr Kopien des zu amplifizierenden Nukleinsäureabschnittes liegen in der Probe vor. Wird kein CP-Wert ermittelt, so liegt auch kein amplifikationsfähiges Zielmolekül in einer Probe vor.

Porphobilinogen Deaminase (PBGD): PBGD ist ein so genanntes "House-keeping-Gen" und wird auf niedrigen Niveau konstitutiv

von allen somatischen Zellen exprimiert. Es fungiert als positive Kontrolle für die Anwesenheit von mRNA in der Probe.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Trennung von Zellfraktionen umfassend Normalzellen und veränderte Zellen bereitgestellt. Die Zellfraktionen aus Normalzellen und veränderten Zellen werden dabei dem Schritt des Inkubierens in einer hypotonen Lösung unterworfen. Dabei findet eine Zerstörung einer oder mehrerer Zellfraktionen statt.

Der Erfahrung liegt die Feststellung zugrunde, dass Zellen eine unterschiedliche Resistenz gegenüber einer hypotonen Lösung aufzeigen, bevor ihre Zellintegrität aufgehoben wird. Genauer wurde von den Erfindern festgestellt, dass veränderte Zellen, wie Tumorzellen, gegenüber hypotonen Einflüssen resistenter sind als Normalzellen.

Diese neue Eigenschaft von veränderten Zellen gegenüber Normalzellen erlaubt die Trennung dieser verschiedenen Fraktionen mit Hilfe einer Inkubation in einer hypotonen Lösung.

Dem Schritt der Inkubation in hypotoner Lösung kann sich ein Aufreinigungsschritt anschließen. Dabei werden die nicht desintegrierten Zellen gesammelt. Anschließend können die so gewonnenen Zellen einer Analyse unterworfen werden. Diese Analyse kann z.B. eine Analyse mit Hilfe der RT-PCR sein.

Die Analyse der gewonnenen Zellen kann das Bestimmen der Expression eines Tumormarkers, wie einer Tumor- assoziierter/spezifischer mRNA, umfassen. Insbesondere dann, wenn dieses Verfahren Teil eines Diagnoseverfahrens von Tumoren ist, wie zirkulierenden und mikrometastasierenden Tumorzellen.

Das erfundungsgemäße Verfahren ermöglicht die Abtrennung von Zellfraktionen, umfassend Normalzellen, die für eine

Hintergrundexpression eines Tumormarkers verantwortlich ist, von veränderten Zellen, wie Tumorzellen, die in einer geringen Zahl in der Untersuchungsprobe vorliegen können. Somit erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren den Nachweis von veränderten Zellen, wie Tumorzellen, in Untersuchungsproben, die aufgrund einer Hintergrundexpression des ausgewählten Tumormarkers durch Normalzellen üblicherweise nicht möglich ist. Die Hintergrundexpression durch Normalzellen kann zu einem falsch positiven Signal in der Untersuchungsprobe führen.

Die Untersuchungsproben können Mischungen von Normalzellen und veränderten Zellen aus Körperflüssigkeiten oder Gewebe sein. Insbesondere kann die Körperflüssigkeit eine der folgenden sein: Blut, Urin, Liquor, Knochenmark, Lymphe, Aszites, Sputum.

Wie oben bereits erwähnt können die veränderten Zellen Tumorzellen sein. Bevorzugt sind die Tumorzellen zirkulierende und/oder mikrometastasierende Tumorzellen von soliden Tumoren wie Karzinomen in Geweben und Körperflüssigkeiten, wo diese Art des Tumors nicht auftritt.

Insbesondere handelt es sich bei den mikrometastasierenden Tumorzellen um Tumorzellen epithelialen Ursprungs.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Untersuchungsprobe um Knochenmark oder Vollblut.

Die Normalzellen der Untersuchungsprobe, welche eine oder mehrere Tumor-assoziierte mRNA-Spezies exprimieren können sein:

Zellen der myeloischen wie der lymphatischen Differenzierungsreihe in unterschiedlichen Reifungsstufen. Hierzu gehören im einzelnen undifferenzierte Myeloblasten und Reifungsstufen bis zum segmentierten Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen; undifferenzierte Megakaryoblasten und

Reifungsstufen bis zum Thrombozyten; Proerythroblasten und Reifungsstufen bis zum Retikulozyten

In der lymphatischen Reihe gehören hierzu Leukozyten der lymphatischen Reihe in unterschiedlichen

Differenzierungsstufen, hierbei insbesondere lymphatische Stammzelle und Reifungsstufen bis zu differenzierten Effektorzellen der T- bzw. B-Lymphozytenreihe.

Diese Normalzellen oder Nicht-Tumorzellen, die entweder im Ruhezustand oder erst im aktivierten/stimulierten Zustand die tumor-assoziierte mRNA exprimieren, werden erfindungsgemäß zuerst unter Verwendung einer hypotonen Lösung aus der Probe eliminiert bevor ein Nachweis der Tumorzellen erfolgt.

Die hypotone Lösung weist eine Osmolalität von kleiner 100 mosm/kg auf. Bevorzugt liegt die Osmolalität der Lösung in einem Bereich von 30-60 mosm/kg, genauer von 40 mosm/kg.

Die hypotone Lösung kann als solche zu den Zellen gegeben werden oder durch Zugabe von Hilfsmitteln wie Sephadex, Aktivkohle, Ionentauscher kann die Osmolalität der Lösung erniedrigt werden. Bevorzugt wird eine hypotone Lösung verwendet basierend auf einer Lösung von Salzen wie z.B.: NaCl, KCl, NH₃Cl, Phosphat buffered Saline (PBS), Hank's Balanced Salt Solution (HBBS) und Mischungen davon.

Die hypotone Lösung kann auch weitere Hilfsstoffe enthalten, die den desintegrierenden Effekt der hypotonen Lösung fördern oder den Abbau von Bestandteilen der disintegrierten Zellen beschleunigen. Diese Hilfsstoffe können sein: ionische sowie nicht-ionische Tenside wie z.B. Saponin, Triton, Tween, Sodiumdodecylsulfat (SDS). Weiterhin Nukleinsäure-abbauende Enzyme (RNAsen und DNAsen) und/oder Protein-abbauende Enzyme (Proteinase K, Pronase oder andere).

Bevorzugt enthält die hypotone Lösung Nukleinsäure-abbauende Enzyme und/oder Protein-abbauende Enzyme, z.B. RNase.

Aufgrund der generellen Instabilität zellulärer mRNA ist es vorteilhaft, dass die Eliminierung der Nicht-Tumorzellen schnell und unmittelbar nach der Probenentnahme vor Ort erfolgt. Die Zeitnähe gewährleistet die Integrität der Untersuchungsprobe und sichert, dass auch kleine Mengen von Tumorzellen in der Probe nachgewiesen werden können (diagnostische Sensitivität).

Die Eliminierung (Zerstörung) erfolgt dabei erfindungsgemäß durch das Inkubieren der Zellen der Untersuchungsprobe in einer hypotonen Lösung. Dabei können dann durch die Zellen freigesetzte Bestandteile, wie RNAsen, oder künstlich zugesetzte Bestandteile, wie Enzyme einschließlich RNAsen, die beschädigten oder lysierten Zellen abbauen und dabei insbesondere deren mRNA -und damit die illegitimen mRNA-Transkripte- beseitigen.

Anschließend kann erfindungsgemäß eine so genannte Stabilisierung der Probe erfolgen. Dieser Schritt des Stabilisierens kann vor oder nach Gewinnung der nicht-zerstörten Zellen erfolgen. Erfolgt die Stabilisierung nach Gewinnung der nicht-zerstörten Zellen führt die Lösung zur Lyse aller verbliebenen Zellen, so wie der veränderten Zellen, insbesondere Tumorzellen, bei gleichzeitiger Stabilisierung der mRNA dieser Zellen. Bei der Lyse muss die Deaktivierung freier Enzyme, die eine Nukleinsäure-abbauende Aktivität aufzeigen, gewährleistet sein, damit diese nicht die nunmehr ebenfalls freigesetzte tumor-assoziierte mRNA der veränderten Zellen, wie Tumorzellen, zersetzen.

Diese Lösung kann zur RNA-Stabilisierung ein hoch konzentriertes chaotropes Salz (z.B. Guanidiniumisothiocyanat oder Guanidiniumhydrochlorid) enthalten.

Die tumor-assoziierte /spezifische mRNA, die bei der Analyse der gewonnenen Zellen nachgewiesen wird, kann ausgewählt sein

aus Cytokeratin 18 (CK18), Cytokeratin 19 (CK19), Cytokeratin 20 (CK20) sowie andere Mitglieder der Cytokeratinfamilie, carcinoembryonic antigen (CEA), ErbB2, ErbB3, Epithelial mucin-1, epithelial mucin-18, guanylyl cyclase C, Cdx-1, Cdx-2, prostate specific antigen (PSA), prostate specific membrane antigen (PSA), Sucrose Isomaltase, Lactase, Carbonanhydrase, Tyrosinase, Thyroglobulin, Tyrosin Hydroxylase, Neuronen-spezifisches Glycoprotein, Desmoplakin I, epitheliales glycoprotein 40 und gastrointestinal Tumor assoziiertes Antigen.

Eine Verstärkung des Lyse-Efektes der hypotonen Lösung auf Zellfraktionen des Blutes ist durch Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen die durch die hypotone Lyse zu zerstörenden Zellfraktionen zusammen mit der Verwendung von Komplement möglich. Hierbei werden Zellen wie z.B. die Granulozyten durch Antikörper gegen Oberflächenantigene wie z.B. CD123, CD125 und Komplement so vorgeschädigt, dass eine geringer hypotone Lösung ($>100\text{mosm/kg}$) in einem folgenden Schritt reicht, um die Zielzellen zu lysieren. Voraussetzung ist, dass die eingesetzten Antikörper in der Lage sind, eine Komplement-Lyse auszulösen.

Antikörper, die keine Komplement-Lyse vermitteln können, können aber in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform ebenfalls genutzt werden, um das System zu ergänzen. Solche Antikörper richten sich gegen Oberflächenantigene auf den Tumorzellen, binden daran und stabilisieren diese, so dass die nachzuweisenden Tumorzellen auch bei sehr niedrigen osmolalen Bedingungen ($< 15\text{mosm/kg}$) intakt bleiben.

Es ist klar, dass das erfindungsgemäße Verfahren in Kombination mit bekannten Verfahren verwendet werden kann.

Das erfindungsgemäße Kit zum Nachweis von Tumorzellen in einer Probe umfasst eine hypotone Lösung, und Primer zum Nachweis der Anwesenheit von mRNA kodierend für einen Marker

für veränderte Zellen, wie Tumorzellen. Dieser Marker kann eine Tumor-assoziierte/spezifische mRNA sein. Wenn die Analyse den Nachweis von mRNA umfasst, enthält das Kit vorteilhafterweise eine RNA-stabilisierende Lösung, umfassend ein hoch konzentriertes chaotropes Salz.

Die im Kit enthaltene hypotone Lösung oder Mittel zur Herstellung hypotoner Verhältnisse führen einer Osmolalität von kleiner 100 mosm/kg. Bevorzugt weist die hypotone Lösung eine Osmolalität von 30-60 mosm/kg auf.

Das erfindungsgemäße Kit kann insbesondere in der Routinediagnostik zur Diagnose von metastasierenden Krebs eingesetzt werden. Dabei werden Tumorzellen in der Untersuchungsprobe nachgewiesen ohne durch illegitime Expression des Markers durch Normalzellen ein falsch positives Signal zu erhalten.

Im Folgenden wird die Erfindung mit Beispielen näher erläutert. Diese Beispiele sollen aber in keiner Weise für die Erfindung einschränkend sein.

Beispiele

1. Herstellung und Messung definierter hypotoner Lösungen

Definierte hypotone Lösungen:

Zur Bestimmung der Osmolalität wurde das folgende Gerät eingesetzt:

Osmometer Fiske Modell 2400 Multisample (Dr. Berthold G. Schlag Wissenschaftliche Messinstrumente Nachf. GmbH, Am Mühlenberg 19, D-51465 Bergisch Gladbach). Es handelt sich um ein marktübliches Gerät zur Bestimmung des osmotischen Drucks mittels der Methode der Gefrierpunktserniedrigung. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

PBS (Phosphate buffered saline, BioWhittaker, BE17-516F, 0,0067 M (PO₄) wurde seriell verdünnt. Die unverdünnte Lösung wurde gleich 100% gesetzt. Verschiedene hypotone Lösungen wurden hergestellt und deren Osmolalität bestimmt (P-Lösungen), siehe Tabelle 1.

Tabelle 1

%PBS	Osmolalität (mosm/kg)
P100	287
P35	103
P30	84
P25	72
P20	58
P15	42
P10	26
P5	13
P1	2

HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, (PAA, Cat No. H15-012) wurde seriell verdünnt. Die unverdünnte Lösung wurde gleich 100% gesetzt. Verschieden hypotone Lösungen wurden hergestellt und deren Osmolalität bestimmt (H-Lösungen), siehe Tabelle 2.

Tabelle 2

%HBSS	Osmolalität (mosm/kg)
H100	276
H50	147
H35	101
H30	86
H20	56
H15	46
H10	24
H5	11
H1	0

Die Bestimmung des Osmolalität der Lösungen wurde wie folgt durchgeführt:

Probenvolumen : Die Meßkammer des Gerätes wurde mit dem für die Messung kalibrierten Probenvolumen von 20 ul beschickt. Die Messung wurde unter geeigneter interner Qualitätskontrolle durchgeführt, um eine gute Präzision der Messungen zu gewährleisten.

Ablauf :

Jeweils 20 ul der unterschiedlichen Verdünnungen einer isotonen Ausgangslösung wurden vollständig ohne Blasenbildung auf den Boden des Probengefässes in einen Probenring pipettiert. Die Messung wird vollautomatisch für bis zu 20 Proben durchgeführt und die Messwerte über den integrierten Drucker ausgegeben.

Referenzbeispiel:

A) Blutzellen allein:

Von freiwilligen Probanden wurde Blut verwendet. Dabei wurde die Koagulation durch vorgelegtes Lithium-Heparin verhindert.

1. 2 ml Heparin-Li Vollblut wurden auf die Reaktionsgefäß aufgeteilt (18 ml der entsprechenden H- / bzw. P- Lösung sind pro Reaktionsgefäß vorgelegt). Durch Schwenken wurden die Lösungen vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Die Zellen wurden bei 350 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in 10 ml Lysepuffer (R&D-Systems, Cat No. WL1000) resuspendiert. Das Mischen erfolgte durch schütteln, nicht durch vortexen.

Der erste Schritt gewährleistet die Elimination der für den „falsch-positive“ Hintergrund verantwortlichen Zellen durch einen hypotonen Schock.

Im zweiten Schritt werden die verbleibenden Zellen (veränderte Zellen/Tumorzellen) wieder gewonnen.

Für die RNA-Isolierung stehen von diesem Schritt ab standardisierte, kommerziell erhältliche Systeme zur Verfügung, die im wesentlichen auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9.) beruhen. Im vorliegenden Fall wurde die RNA mittels eines Kits der Firma Qiagen (QIAamp RNA Blood Mini Kit, Cat No:523003, Qiagen, Hilden) isoliert. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

3. Die isolierte RNA wurde mit 30 μ l ddH₂O aus der Membran eluiert und in einer Vakuumzentrifuge einkonzentriert. Das Pellet wurde in 13 μ l ddH₂O resuspendiert.

4. 3 μ l wurden für die Bestimmung der RNA-Konzentration eingesetzt.

5. Für die cDNA-Synthese wurden 10 μ l RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese ist Bestandteil des Roche CK20 PCR-Kits (Cat No. 3118 835) und wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

6. Von der erhaltenen cDNA wurden 4 μ l in die CK-20 LightCycler-PCR eingesetzt und diese wurde gemäß den Herstellerbestimmungen durchgeführt.

7. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit der LightCycler Software 3.5.

B) Blutzellen mit eingemischten Tumorzellen:

1. HT29 Kolonkarzinomzellen wurden mit Accutase™ (PAA-Laboratories GmbH, Cat No. L11-007) von ihrem Untergrund gelöst (3ml pro T175 Kulturflasche). Zur Inaktivierung der Accutase wurden die 3ml auf 30ml mit Zellkulturmedium (RPMI 1640 + 10% FCS, + 2mM Glutamin, + 1mM Natriumpyruvat, Invitrogen, Life Technologies Karlsruhe) aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (1400 upm/ 5 min.). Das Pellet wurde in 20 ml resuspendiert und die Zellzahl der Lösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die gewünschte Zellzahl/ml wurden dann durch weitere Verdünnung mit Kulturmedium hergestellt.

Werden Zellzahlen >100 pro Ansatz eingemischt, so wird diese Zellzahl durch Verdünnung eingestellt. Bei Zellzahlen <100 werden die Tumorzellen mit Hilfe eines Mikromanipulators aus der resuspendierten Tumorzellsuspension herausgezählt und in ein Reaktionsgefäß überführt, in welchem 100 μ l PBS oder HBSS vorgelegt sind. Die Einmischung in das Blut erfolgt durch Zugabe der 100 μ l bevor das Blut (2ml) mit der entsprechenden P- bzw. H-Lösungen gemischt wird.

Die weiteren Schritte der Aufarbeitung und Auswertung erfolgte wie unter A) 1. bis 7 beschrieben.

Beispiel 1:

Einem Spender wurde Blut entnommen. Dieses wurde in zwei Ansätze geteilt. Der erste Ansatz wurde ohne Bemischung, der zweite mit Bemischung von 1000 HT29 Tumorzellen durchgeführt. Da für die CK-20 PCR nur 1/5 der erzeugten cDNA eingesetzt werden kann, entsprechen die Signale denen von 200 HT29-Zellen. Die Proben wurden gemäß Referenzbeispiel aufgearbeitet und analysiert.

Figur 1a zeigt die Ergebnisse für den Versuch ohne eingemischte Tumorzellen. Bei der Behandlung von Blutzellen mit einer 276 mosmolalen Lösung (H100) lassen sich CK20- und PBGD-Signale nachweisen. Nach Behandlung mit H-Lösungen (H15-H0) mit einer niedrigeren Osmolalität (<46 mosm/kg) ist kein CK20-Signal mehr nachweisbar, wohl aber das PBGD-Signal (genug Probenmaterial war also vorhanden).

Figur 1b zeigt die Ergebnisse für den Versuch mit eingemischten Tumorzellen (HT29). Auch nach Behandlung der Probe mit niedrig und sehr niedrig osmolalen Lösungen (H15, H0) waren CK20- und PBGD-Signale nachweisbar. Da in dem Parallelansatz ohne Tumozelleinmischung bei Osmolalitäten kleiner 46mosm/kg kein CK20-Signal mehr nachweisbar war, sind

diese Signale eindeutig auf die eingemischten Tumorzellen zurückzuführen.

Die in den Figuren gezeigten Ergebnisse stellen repräsentative Auszüge aus mehreren Versuchen mit unterschiedlich hypotonen Lösungen dar. Über die in den Figuren dargestellten Versuche hinausgehende Experimente sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefasst.

Tabelle 3

H-Lösung	Positiver Nachweis des CK20-Signals (Blutzellen allein)	Positiver Nachweis des PBGD-Signals (Blutzellen allein)
	Pos. Nachw./Anzahl d. Vers.	Pos. Nachw./Anzahl d. Vers.
H100	6/6	6/6
H20	2/6	6/6
H15	0/8	8/8
H10	0/4	4/4
H5	0/3	3/3
H1	0/3	3/3
H0	0/4	4/4

Tabelle 3 :Nachweis des CK20-/PBGD-Signals in Blutzellen in Abhängigkeit der eingesetzten hypotonen Salzlösungen (H-Lösung) .

Der Einsatz einer 56 mosmolaren Lösung (H20) führte bereits zu einer 60%igen Elimination des CK20 Signals bei 100%igem Nachweis des PBGD-Signals. Eine 100%ige Elimination des CK20-Hintergrundsignals wurde mit einer ca.42 mosmolaren Lösung (H15) erzielt. Das PBGD-Signal blieb ebenfalls zu 100% erhalten. Abkürzungen: Pos. Nachw. (Positive Nachweise), Anzahl d. Vers. (Anzahl der Versuche)

Tabelle 4

H-Lösung	Positiver Nachweis des CK20-Signals (Blutzellen + HT29 Tumorzellen)	Positiver Nachweis des PBGD-Signals (Blutzellen + HT29 Tumorzellen)
	Pos. Nachw./Anzahl d. Vers.	Pos. Nachw./Anzahl d. Vers.
H100	3/3	3/3
H20	3/3	3/3
H15	3/3	3/3
H0	3/3	3/3

Tabelle 4: Nachweis des CK20-/PBGD-Signals in Blutzellen mit eingemischten Tumorzellen in Abhängigkeit der eingesetzten hypotonen Salzlösungen (H-Lösung).

Unter allen Versuchsbedingungen waren sowohl das CK20- als auch das PBGD-Signal nachweisbar. D.h. Tumorzellen sind resistent gegen die eingesetzten hypotonen Lösungen und lassen sich so von Blutzellen unterscheiden.

Weitere Versuche bei denen geringere Tumorzellzahlen eingemischt wurden ergaben, dass CK20 Signale von 5 Tumorzellen nachweisbar sind.

Beispiel 2

Einem Spender wurde Blut entnommen. Dieses wurde in zwei Ansätze geteilt. Der erste Ansatz wurde ohne Bemischung, der zweite mit Bemischung von 25 HT29 Tumorzellen durchgeführt.

Die Proben wurden gemäß Referenzbeispiel aufgearbeitet und analysiert.

Da für die CK-20 PCR nur 1/5 der erzeugten cDNA eingesetzt werden kann, entsprechen die Signale denen von 5 HT29-Zellen. Bei diesem Spender konnte das Hintergrundsignal mit Hilfe der

hypotonen Lösungen bereits bei einer Osmolalität von 103 mosm/kg erreicht werden.

Figur 2 zeigt das Ergebnis der quantitativen RT-PCR für CK20 und PBGD. Ohne Behandlung der Blutzellen mit hypotonen Lösungen sind CK20- und PBGD-Signal nachweisbar (Blut allein). Die Inkubation mit einer P35-Lösung (103 mosm/kg) führt zur Eliminierung des CK20 Signals. Das PBGD-Signal bleibt erhalten (mit P35). In dem Parallelansatz, welcher 25 HT29-Tumorzellen enthielt, bleibt das CK20-Signal nachweisbar (Blut+ 25Ht29+ P35).

Beispiel 3

Verbesserung der Lyse-Ergebnisse durch Zugabe von RNase A

Beispiel 1 wurde wiederholt. Damit die RNA der durch die P-/H-Lösung lysierten Blutzellen vor der endgültigen Lyse durch den Guanidiniumisothiocyanat enthaltenden RLT-Puffer schnell abgebaut werden kann, wurde dem Blut vor der Behandlung mit P- bzw.- H-Lösung RNase A (1mg/Ansatz) zugesetzt. Dies führte zu einer Verbesserung der Lyse-Ergebnisse, d.h. die Lyse war auch mit höher osmolalen Lösungen möglich.

Beispiel 4

Primäre Wirkung der P- bzw. H-Lösungen auf Granulozyten als Zellfraktion der Normalzellen in der Untersuchungsprobe

Der Befund, dass das CK20-Signal von der Granulozytenfraktion der Leukozyten exprimiert wird, unterstreicht die hier dargestellten Ergebnisse. Es wurde mittels FACS-Analyse die Zusammensetzung der Blutzellfraktionen mit und ohne P- bzw. H-Lösungen untersucht, und es konnte in Übereinstimmung mit den CK20-Daten eine deutliche Abnahme der Granulozyten beobachtet werden.

Der deutlichste Abfall findet bei einer Osmolalität von 25-40 mosm/kg statt.

Die Versuche wurde wie folgt durchgeführt:

1. Es wurden 4 ml Heparinblut mit jeweils 100ul Antikörperlösung gegen die Oberflächenantigen CD45/CD14 (Simultest LeucoGate, BD-Biosciences, Kat No: 342408) und CD16 (Caltag, Cat No: MHCD1606) gemäß Herstellerangaben gemischt und 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.
2. Es wurden 24 FACS-Röhrchen mit je 2ml H-Lösung vorbereitet.
3. Nach Zugabe von je 150ul Blut pro 2ml H-Lösung und gutem Mischen wurde diese 15 min bei RT inkubiert.
4. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 300 xg; 5 min an.
5. Das Pellet wurde in 2-3 ml R&D-Erylysepuffer (R&D-Systems, Cat No. WL1000) resuspendiert.
6. Es folgte eine 10 min Inkubation bei RT.
7. Die Proben wurden bei 300 x g; 5 min zentrifugiert.
8. Das Pellet wurde mit 2-3 ml Waschpuffer (R&D-Systems, Cat No. WL1000) gewaschen.
9. Es folgte wieder eine Zentrifugation bei 300 x g; 5 min und ein Waschen mit 5ml Cellwash (BD Biosciences Cat No: 349524). Anschließend wurde erneut bei 300 x g; 5 Min. zentrifugiert.
10. Das Pellet wurde in 500 ul Cellwash (BD Biosciences Cat No: 349524) resuspendiert gefolgt von der Zugabe von 60 ul Fixativ (R&D-Systems, Cat No. WL1000)
11. Die FACS-Messung mit Immunolog. Diff.-Oberfläche erfolgte mit dem FACSCalibur (BD Biosciences, Deutschland)

Die Figur 3 zeigt den relativen Anteil der Granulozyten-Subpopulationen von Blutzellen innerhalb der Blutzellen in Abhängigkeit der Behandlung mit hypotonen Lösungen.

In Abhängigkeit der Behandlung mit hypotonen Lösungen ist eine Abnahme der Granulozytenpopulation zu erkennen. Diese Abnahme ist sehr drastisch bei Lösungen zwischen 20-40 mosm/kg. Der relative Anteil der Granulozyten an der Gesamtzellzahl fällt in diesem Bereich von ca.66% auf ca.13%. Bei Lösungen < 20 mosm/kg stabilisiert sich der Anteil den Granulozyten auf einem Niveau von ca. 10% an der Gesamtzellzahl.

Es sind drei unabhängige Experimente gezeigt, welche durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet sind.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Trennung von Zellfraktionen umfassend Normalzellen und veränderte Zellen umfassend den Schritt des Inkubierens der Mischung von Normalzellen und veränderten Zellen in einer hypotonen Lösung und Zerstörung einer oder mehrerer Zellfraktionen davon.
2. Verfahren nach Anspruch 1 weiterhin umfassend den darauf folgenden Schritt des Gewinnens der nicht-zerstörten Zellfraktion.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 weiterhin umfassend den anschließenden Schritt der Analyse der Zellen der gewonnenen Zellfraktionen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Analyse der gewonnenen Zellen durch Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgt.
5. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüchen, wobei die Mischung von Normalzellen und veränderten Zellen aus Körperflüssigkeiten oder Gewebe stammen.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Körperflüssigkeit ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Blut, Urin, Liquor, Knochenmark, Lymphe, Azytes, Sputum.
7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die veränderten Zellen Tumorzellen sind.
8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Tumorzellen zirkulierende und/oder mikrometastasierende Tumorzellen sind.

9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Normalzellen nur mononukleare Zellen aus dem Blut sind.
10. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Tumorzellen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus der Gruppe der soliden bösartigen Tumore epithelialen Ursprungs (Karcinome).
11. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Osmolalität der hypotonen Lösung kleiner 100 mosm/kg ist.
12. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die hypotone Lösung eine Salzlösung ist ausgewählt aus den Salzen NaCl, KCl, NH₄Cl, Phosphat buffered Saline (PBS), Hank's Balanced Salt Solution (HBBS) und Mischungen davon.
13. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die hypotone Lösung weiterhin Nukleinsäure-abbauende Enzyme und/oder Protein-abbauende Enzyme enthält.
14. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die hypotone Lösung weiterhin RNase enthält.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 14, wobei die Analyse der gewonnenen Zellen das Bestimmen der Expression eines Tumormarkers umfasst.
16. Verfahren nach Anspruch 17, wobei der Tumormarker ausgewählt ist aus Cytokeratin 18 (CK18), Cytokeratin 19 (CK19), Cytokeratin 20 (CK20) und weitere Mitglieder der Cytokeratinfamilie, carcinoembryonic antigen (CEA), ErbB2, ErbB3, Epithelial mucin-1, epithelial mucin-18, guanylyl cyclase C, Cdx-1, Cdx-2, prostate specific antigen (PSA), prostate specific membrane antigen (PSM), Sucrose Isomaltase, Lactase, Carbonanhydrase,

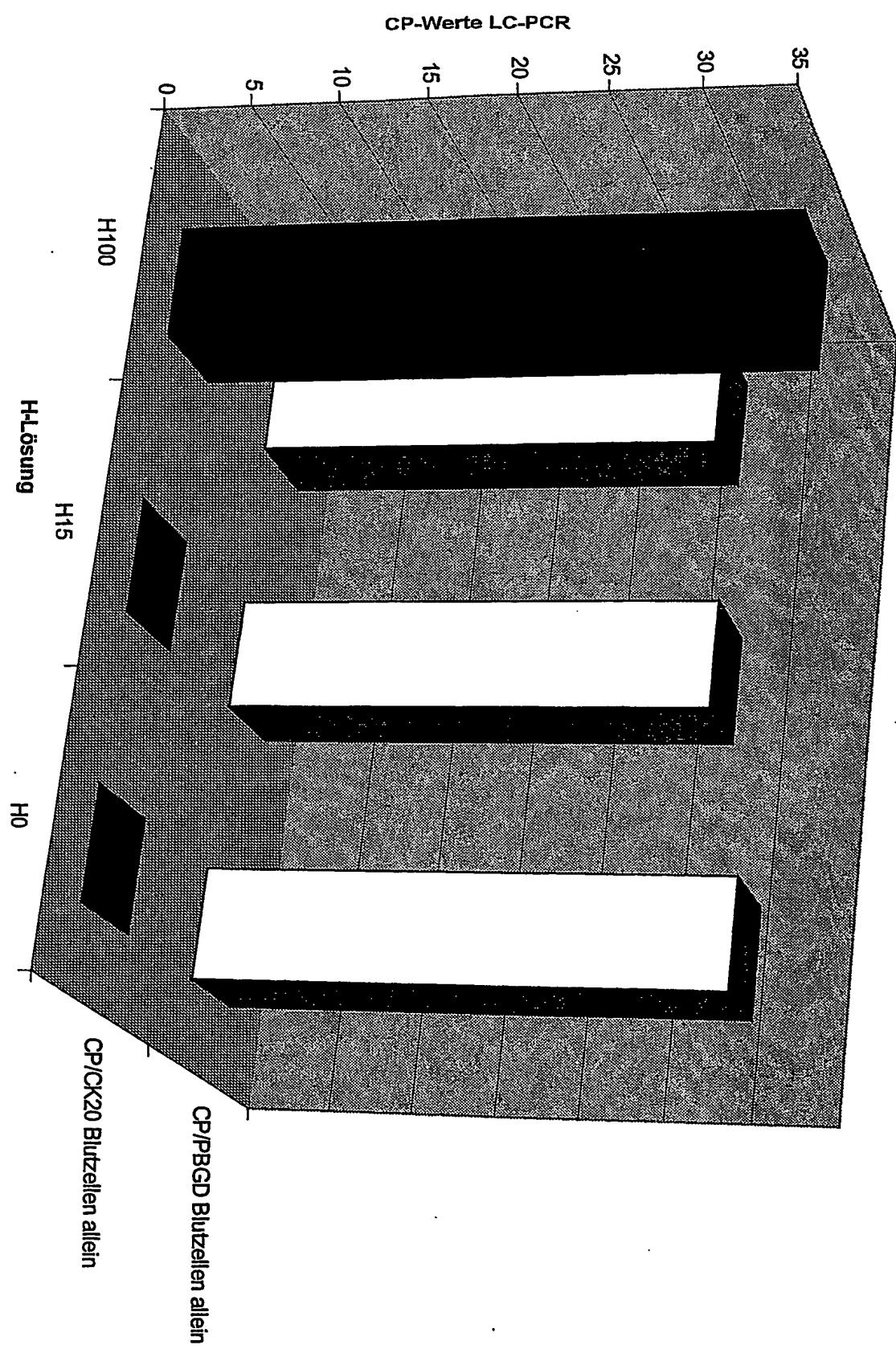
Tyrosinase, Thyroglobulin, Tyrosin Hydroxylase,
Neuronen-spezifisches Glycoprotein, Desmoplakin I,
epitheliales glycoprotein 40 und gastrointestinal Tumor
assoziiertes Antigen

17. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 zum Nachweis von veränderten Zellen, insbesondere Tumorzellen.
18. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 3 bis 19 zur Diagnose von metastasierendem Krebs.
19. Kit zum Nachweis von Tumorzellen in einer Probe umfassend
 - a) eine hypotone Lösung, und
 - b) Primer zum Nachweis der Anwesenheit von mRNA codierend für einen Marker.
20. Kit gemäß Anspruch 19, weiterhin umfassend
 - c) eine RNA-stabilisierende Lösung, umfassend ein hoch konzentriertes chaotropes Salz.
21. Kit gemäß Anspruch 19 oder 20, wobei die hypotone Lösung eine Osmolalität von kleiner 100 mosm/kg aufweist.
22. Kit gemäß einem der vorherigen Ansprüche, wobei die hypotone Lösung eine Salzlösung ist, ausgewählt aus den Salzen NaCl, KCl, NH₄Cl, Phosphat buffered Saline (PBS), Hank's Balanced Salt Solution (HBBS) und Mischungen davon.
23. Kit gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Diagnose von metastasierendem Krebs.

24. Kit gemäß einem der vorherigen Ansprüche, wobei der Marker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
Cytokeratin 18 (CK18), Cytokeratin 19 (CK19),
Cytokeratin 20 (CK20) und weitere Mitglieder der
Cytokeratinfamilie, carcinoembryonic antigen (CEA),
ErbB2, ErbB3, Epithelial mucin-1, epithelial mucin-
18, guanylyl cyclase C, Cdx-1, Cdx-2, prostate specific
antigen (PSA), prostate specific membrane antigen (PSM),
Sucrose Isomaltase, Lactase, Carbonanhydrase,
Tyrosinase, Thyroglobulin, Tyrosin Hydroxylase,
Neuronen-spezifisches Glycoprotein, Desmoplakin I,
epitheliales glycoprotein 40 und gastrointestinal Tumor
assoziiertes Antigen
25. Verwendung eines Kits gemäß Ansprüchen 19 bis 24 zum
Nachweis von Tumorzellen in einer Probe.

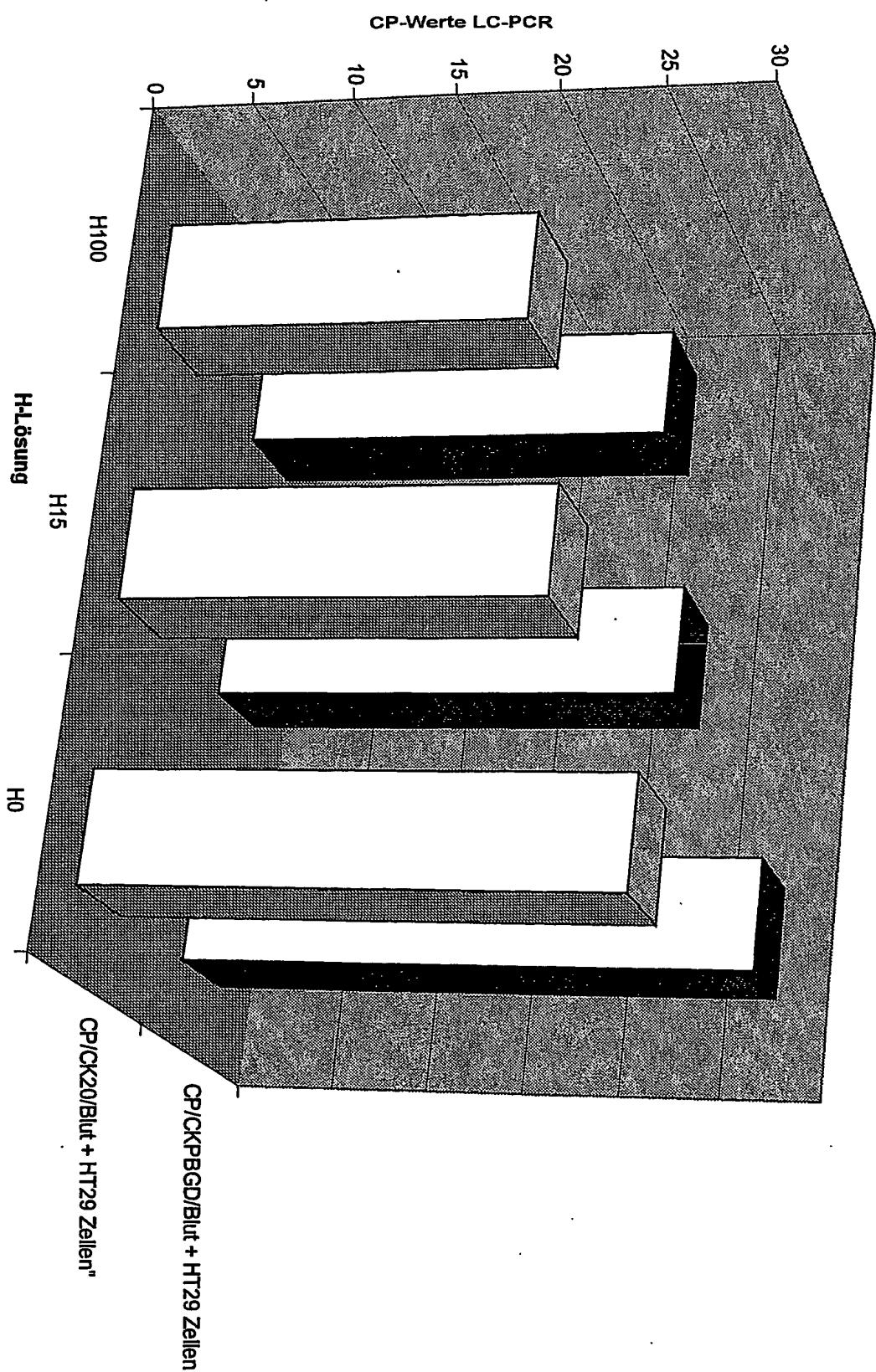
ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung von Zellen, insbesondere zur Probenaufbereitung in der Tumordiagnostik. Genauer betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Probenaufbereitung zum Nachweis von Tumorzellen solider Tumoren bei der Diagnostik zur Prognose und Stratifizierung der Therapie, umfassend das Zerstören von Zellen, die diese Diagnosemöglichkeit erschweren bzw. gänzlich unmöglich machen. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit zur Probenaufbereitung und zum Nachweis von veränderten Zellen. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des Verfahrens und des Kits in der Diagnostik von veränderten Zellen, wie Tumorzellen, und der Durchführung einer PCR-Reaktion zum Nachweis von Tumorzellen in Körperflüssigkeiten und Geweben.

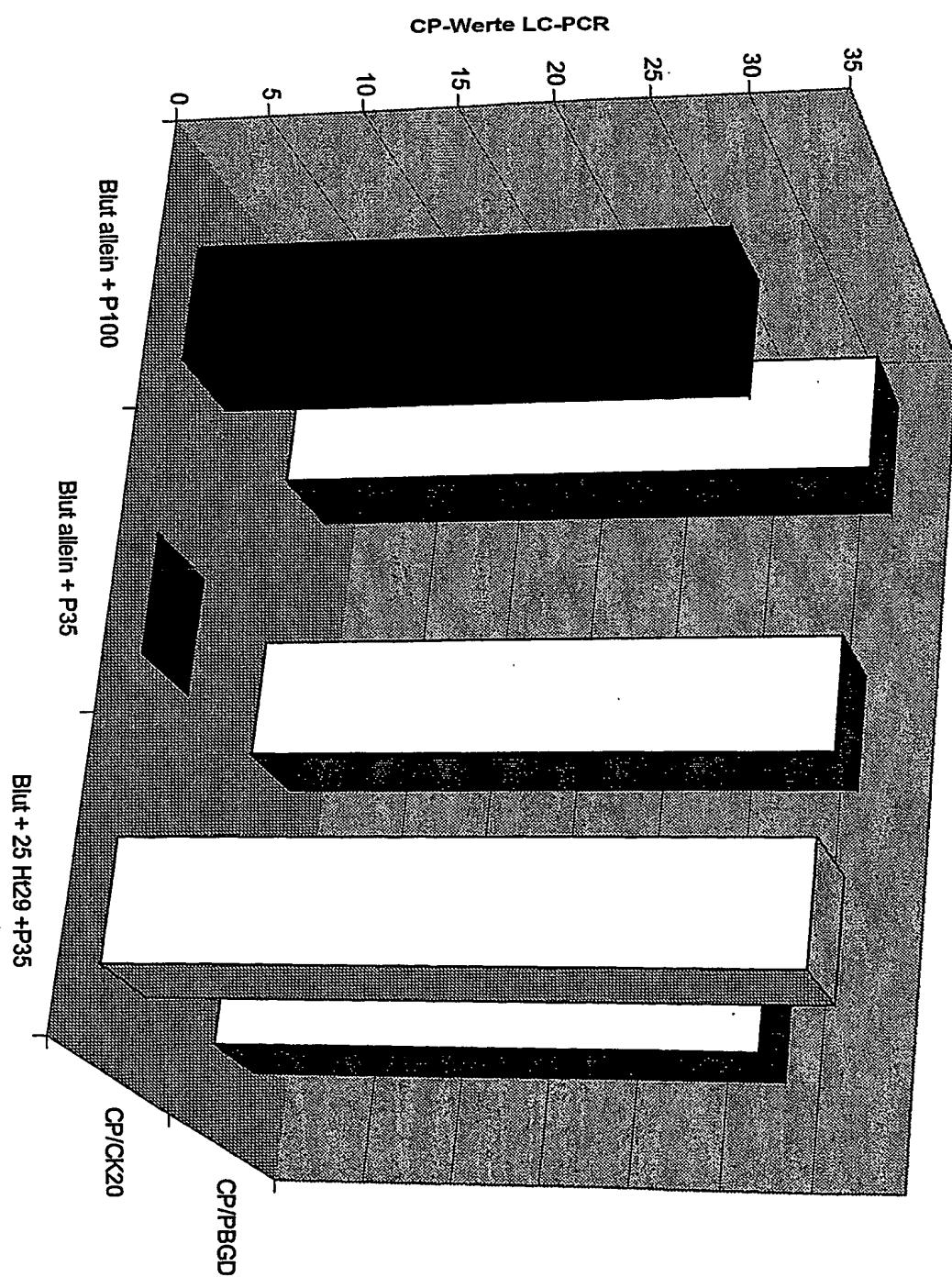


Figur 1a

2/4



Figur 1b



Figur 2

Figur 3

44

